

0-734007-|

КАЗАНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

На правах рукописи

ИЛЬИЧЕВА НАТАЛЬЯ ЮРЬЕВНА

**ИММУНОЭКСТРАКЦИЯ ОСТАТОЧНЫХ КОЛИЧЕСТВ ПЕСТИЦИДОВ  
РАЗЛИЧНЫХ КЛАССОВ С АМПЕРОМЕТРИЧЕСКИМ  
ДЕТЕКТИРОВАНИЕМ**

02.00.02 - аналитическая химия

**А в т о р е ф е р а т**  
**диссертации на соискание ученой степени**  
**кандидата химических наук**

Казань - 2003

Работа выполнена на кафедре аналитической химии Казанского государственного университета

Научный руководитель: доктор химических наук,  
профессор Э.П.МЕДЯНЦЕВА

Научный консультант: академик РАЕН, академик МАНВШ,  
доктор химических наук,  
профессор Г.К. БУДНИКОВ

Официальные оппоненты: доктор химических наук,  
профессор В.Ф. НОВИКОВ

кандидит химических наук,  
доцент Г.А. БООС

Ведущая организация: Саратовский государственный  
университет имени Н.Г. Чернышевского,  
г. Саратов

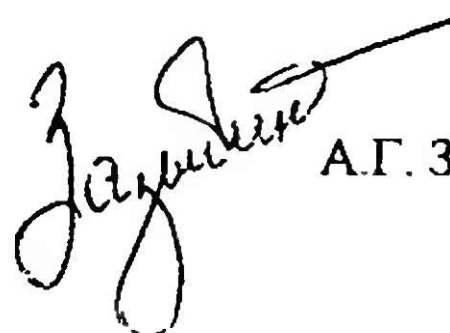
Защита состоится "15" мая 2003 г. в 14.00 часов на заседании диссертационного Совета К 212.081.04 по химическим наукам Казанского государственного университета, 420008, г. Казань, ул. Кремлевская, 18, химический факультет, Бутлеровская аудитория.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке им. Н.И. Лобачевского Казанского государственного университета.

Отзывы на автореферат просим присылать по адресу: 420008, г. Казань, ул. Кремлевская, 18, КГУ, научная часть.

Автореферат разослан "14" апреля 2003 г.

Ученый секретарь диссертационного  
совета, кандидат химических наук

  
А.Г. ЗАЗЫБИН

Актуальность темы. Разработка эффективных способов определения следовых количеств пестицидов является актуальной задачей современной аналитической химии. Пестициды и их метаболиты как вещества, способные проявлять физиологическую активность, могут представлять опасность для здоровья человека, присутствуя в воде, пищевых продуктах.

Одним из перспективных направлений создания новых аналитических методов для определения пестицидов является разработка биосенсорных устройств. Достижения последних лет в области создания электрохимических сенсоров, связанные с появлением и внедрением новых технологических и конструктивных решений, способствуют совершенствованию биосенсоров. Все более широко в практику входят планарные электроды, изготовленные с помощью печатных технологий, которые предназначены для одноразового или многократного использования. Создание новых био- и иммуносенсоров на их основе с использованием различных вариантов модификации электродной поверхности находится в русле мировых тенденций развития электроаналитической химии. Однако наряду с тем, что амперометрическое детектирование характеризуется низкими пределами обнаружения и может обеспечить достаточную чувствительность для определения следовых количеств загрязняющих веществ, в то же время при использовании электрохимических датчиков не всегда можно достичь необходимой селективности.

Проблему обеспечения избирательности определений можно решить путем комбинирования электрохимического детектирования с методом разделения, основанным на использовании иммунохимических реакций. Весьма перспективным в этом плане может быть использование иммунохимических экстрагирующих реагентов, иммобилизованных на подходящих носителях. Использование в рамках такого иммуноэкстракционного метода простых и экономичных подходов определения пестицидов может позволить осуществлять надежный экомониторинг остаточных количеств пестицидов в реальном масштабе времени.

Следует также отметить, что до недавнего времени основное внимание уделяли разработке иммунохимических методов анализа для определения пестицидов в воде, тогда как аналитические возможности иммунохимических реакций в органических и водно-органических средах практически не изучались. Тем не менее, такие исследования имеют несомненную теоретическую ценность, а кроме этого могут позволить расширить горизонты практического применения методов иммуноанализа.

Работа проводилась при поддержке грантов Российского фонда фундаментальных исследований (номера проектов № 97-03-33232а, № 00-03-32389а) и международного гранта INCO Copernicus (номер проекта ERBIC 15 CE-98-0910).



**Цель исследования** заключалась в разработке новых вариантов иммуноэкстракционного определения пестицидов разных классов с использованием иммобилизованных антител и холинэстеразных биосенсоров различной конструкции, выборе рабочих условий его проведения на основе изучения характеристик электрохимических, ферментативной и иммунохимических реакций.

**Научная новизна и практическая значимость.** Показана возможность определения пестицидов различных классов (фосфорорганического инсектицида параоксона, анилидного гербицида пропанила, сульфонилмочевинного гербицида хлорсульфурона, триазиновых гербицидов атразина и симазина), используя эффекты ингибирования и активации на холинэстеразы разного происхождения, входящие в иммобилизованном состоянии в состав холинэстеразных биосенсоров. Впервые установлено и исследовано активирующее действие анилидного пестицида пропанила на иммобилизованную холинэстеразу. Определены кинетические параметры реакции холинэстеразного гидролиза (кажущиеся константы Михаэлиса, максимальные скорости реакции) в присутствии пропанила. Установлено влияние различных факторов на характер протекания ферментативного процесса.

Разработаны два типа холинэстеразных биосенсоров на основе планарных систем с использованием ацетилхолинэстераз электрического угря и сыворотки крови человека и бутирилхолинэстеразы сыворотки крови лошади.

Разработаны два способа иммобилизации антител на промышленно выпускаемых ацетатцеллюлозных и нитратцеллюлозных мембранных фильтрах. Определены константы связывания иммунных комплексов антитело-антиген, как характеристики полученных иммуноэкстрагентов. Изучена способность иммобилизованных антител к иммунохимическим взаимодействиям в водно-органических растворах. Оценены константы связывания иммунных комплексов антитело-антиген в водно-органических растворах.

Предложены варианты иммуноэкстракционного определения пестицидов с использованием иммобилизованных антител как иммуноэкстрагентов в водных и водно-органических средах. Разработаны методики иммуноэкстракционного определения пестицидов с использованием амперометрических холинэстеразных биосенсоров в различных пищевых продуктах.

**На защиту выносятся:**

-результаты изучения действия пестицидов различных классов (фосфорорганического инсектицида параоксона, анилидного гербицида пропанила, сульфонилмочевинного гербицида хлорсульфурона, триазиновых гербицидов атразина и симазина) на каталитическую активность холинэстераз



различного происхождения, входящих в состав разработанных холинэстеразных биосенсоров;

-совокупность факторов, определяющих величину аналитических сигналов при работе с различными амперометрическими холинэстеражными биосенсорами;

-использование кинетических параметров ферментативной реакции для выбора рабочих условий определения;

-результаты исследований, проведенных с целью получения антител, иммобилизованных на различных промышленно выпускаемых мембранных фильтрах, для использования в качестве иммуноэкстрагентов;

-оценка и сопоставление значений констант связывания иммунных комплексов антитело-пестицид, полученных в различных условиях;

-влияние некоторых растворителей на иммунологические реакции антитело-пестицид;

-варианты иммуноэкстракционного определения пестицидов пропанила, параоксона, атразина и симазина с помощью иммобилизованных антител как иммуноэкстрагентов и амперометрических холинэстеразных биосенсоров;

-иммуноэкстракционные методики определения пестицидов в пищевых продуктах: параоксона в апельсинах и винограде, пропанила в рисе, симазина в молоке и молочных продуктах, атразина в воде и апельсиновом соке.

**Апробация работы.** Материалы диссертации докладывались и обсуждались на Всероссийской конференции "Химический анализ веществ и материалов" (Москва, 2000), IV Всероссийской конференции по анализу объектов окружающей среды "Экоаналитика-2000" с международным участием (Краснодар, 2000), Поволжской региональной конференции по аналитической химии (Казань, 2001), Симпозиуме по высокоэффективным методам разделения (Сиофок, 2001), Всероссийской конференции молодых ученых "Современные проблемы теоретической и экспериментальной химии" (Саратов, 2001), Международной конференции "Биокатализ-2002" (Москва, 2002), итоговой научной конференции Казанского государственного университета (2002г.).

**Публикации** По теме диссертации опубликовано 16 работ. Из них 3 статьи и 13 тезисов докладов на всероссийских и международных конференциях.

**Структура и объем работы** Диссертация изложена на 165 страницах машинописного текста, содержит 26 таблиц, 18 рисунков (из них 6 в приложении). Работа состоит из введения, шести глав, заключения, выводов, списка литературы, включающем 181 ссылку, и приложения.

В первой главе представлен обзор литературы по современным методам анализа пестицидов в воде и пищевых продуктах.

Вторая глава литературного обзора посвящена использованию иммунохимических методов определения пестицидов в различных объектах.

Третья глава содержит постановку задачи, описание объектов исследования, методы и условия эксперимента.

В четвертой главе представлены результаты исследования действия пестицидов разных классов на холинэстеразные биосенсорные системы с использованием холинэстераз различного происхождения и трансдюсеров. Проведена сравнительная характеристика аналитических возможностей изученных биосенсоров.

Пятая глава посвящена описанию новых способов получения иммобилизованных антител на промышленно выпускаемых мембранных фильтрах. Охарактеризованы свойства получаемых иммунореагентов. Предложены рабочие условия проведения иммунохимических определений с их использованием в воде. Часть главы посвящена изучению иммунологических реакций антитело-пестицид в присутствии некоторых растворителей. Обсуждено влияние растворителей на аналитические характеристики (чувствительность определения, аффинность иммунологических взаимодействий).

В шестой главе описаны варианты иммуноэкстракционного определения пестицидов с амперометрическим детектированием. Представлены методики определения пестицидов: параоксона в фруктах, пропанила в рисе, симазина в молоке и молочных продуктах, атразина в воде и апельсиновом соке.

### Экспериментальная часть

Экспериментальная часть выполнена с использованием различных холинэстеразных биосенсоров. Один из них – амперометрический холинэстеразный биосенсор (АХЭБ) – на основе стационарного ртутно-пленочного электрода с серебряной подложкой и бутирилхолинэстеразы (БуХЭ), иммобилизованной в мембрану из нитрата целлюлозы (НЦ). Работа с таким типом биосенсора проводилась на осциллографическом полярографе ПО-5122 модели 03 и потенциостате ПИ 50-1.1, совмещенном с компьютером IBM PC-286, с ячейкой, термостатированной при  $(25 \pm 0.2)^{\circ}\text{C}$ . Основой второго типа холинэстеразных биосенсоров служили одноканальные и многоканальные планарные печатные системы на керамической подложке, изготовленные фирмой BVT Technologies, Брно, Чехия. Одноканальная система содержит один рабочий электрод, изготовленный из платиносодержащей пасты. Четырехканальная система включает 4 одинаковых платиновых рабочих электрода на единой керамической подложке. Псевдоелектродом сравнения служила серебряная проволока, впаянная в рабочую микроячейку (объем 200 мкл), которая в растворах иодидсодержащих субстратов образует  $\text{Ag}/\text{AgI}$  электрод. Измерения с использованием этих электродов проводили в потенциостатическом режиме с помощью электрохимического детектора



"МЭВ" с компьютеризированным управлением, разработанного в рамках совместного международного гранта INCO-Copernicus.

Объекты исследования: хроматографически чистые пестициды пропанил, симазин, атразин, параоксон, хлорсульфурон и соответствующие Ат к ним. Использовали субстраты холинэстеразы бутирилтиохолин иодид (БТХИ) и ацетилтиохолин иодид (АТХИ) ("Sigma"). Применяли препараты холинэстераз (ХЭ): БуХЭ сыворотки крови лошади (КФ 3.1.1.8) с активностью 25, 110 и 135 АЕ/мг; ацетилхолинэстеразу (АХЭ) человека (КФ 3.1.1.7) с активностью 2.2 АЕ/мг, изготовленные НПО «Биомед», г.Пермь, а также холинэстеразные электроды на основе печатных платиновых электродов с иммобилизованной АХЭ электрического угря и БуХЭ сыворотки крови лошади ("Sigma"). Применяли органические растворители высокой чистоты (бутилацетат, толуол, гексан, этанол, метанол, ацетонитрил, ацетон) "Реахим" и ЗАО "Лаверна", а также 25%-ный раствор глутарового альдегида (ГА), бычий сывороточный альбумин (БСА) и сывороточный альбумин человека (САЧ) фирмы "Reanal" (Венгрия).

Для получения сенсорной части АХЭБ в качестве носителя использовали НЦ типа коллоксилин, из которой получали пленки с включенным в их состав ферментом. В качестве носителей для иммобилизованных антител (ИАт) использовали такой же тип НЦ, что и для БуХЭ, а также промышленно изготавливаемые НЦ мембранные фильтры фирмы "Sartorius" (размер пор 0.2 мкм) и ацетатцеллюлозные (АЦ) фильтры ЗАО НТЦ "Владипор" (0.2 и 1 мкм).

### **Оценка аналитических возможностей холинэстеразных биосенсоров различных конструкций в определении пестицидов**

В качестве детекторов на пестициды при проведении иммуноэкстракционного определения предлагается использовать холинэстеразные биосенсоры на основе различных трансдьюсеров.

В основе получения аналитического сигнала *амперометрического холинэстеразного биосенсора* лежит электрохимическая реакция обратимого восстановления меркаптида ртути, образующегося при взаимодействии продукта ферментативного гидролиза субстрата (тиола) с материалом электрода (ртутью). В присутствии эффекторов величина аналитического сигнала биосенсора меняется пропорционально концентрации пестицида.

Установлено, что фосфорорганический инсектицид параоксон оказывает ингибирующее действие на иммобилизованную холинэстеразу (ИХЭ) в составе АХЭБ в области концентраций от  $5 \times 10^{-10}$  до  $1 \times 10^{-6}$  М. Гербицид пропанил, ранее не изучавшийся как возможный эффектор ХЭ, оказывает активирующее действие на ИХЭ в области концентраций от  $1 \times 10^{-12}$  до  $1 \times 10^{-9}$  М.

Природа ингибирующего действия параоксона, как известно, связана с



тем, что этот пестицид способен взаимодействовать с активным центром ХЭ, в результате чего происходит необратимое фосфорилирование гидроксила серина. Предположительным объяснением активирующего действия пропанила на ИХЭ может быть гидрофобное взаимодействие с соответствующими областями ХЭ вблизи активного центра. Представляло интерес провести исследование кинетических параметров холинэстеразного гидролиза при варьировании некоторых условий его проведения (концентраций субстрата и эффектора). Полученные значения кинетических параметров ферментативной реакции при различных значениях концентраций пропанила, рассчитанные для оценки реакционной способности эффектора по отношению к ИХЭ, представлены в табл. 1.

Анализ полученных данных показывает, что вид эффекта в каждом конкретном случае зависит от соотношения концентраций эффектора и субстрата. При концентрациях субстрата  $2 \times 10^{-3}$  и  $1 \times 10^{-3}$  М наблюдаются различные типы активирующего действия пропанила на ИХЭ, при чем во всех случаях скорость ферментативного процесса увеличивается. При более низких концентрациях субстрата ( $8 \times 10^{-4}$  М) и гербицида эффекты активации не наблюдались, что выражалось в отсутствии изменения кинетических параметров ферментативной реакции.

Таблица 1.

Кинетические параметры гидролиза БТХИ в присутствии ИХЭ и различных концентраций пропанила

С <sub>БТХИ</sub> , моль/л	С <sub>пестицида</sub> , моль/л	K <sub>m</sub> ×10 <sup>4</sup> , моль/л	V <sub>max</sub> ×10 <sup>7</sup> , моль/л×сек	Соотношение параметров K <sub>m</sub> и V <sub>max</sub>	Тип эффекта
$2 \times 10^{-3}$	0	19.5±0.4	3.3±0.4		
	$5 \times 10^{-10}$	7.9±0.2	4.4±0.5	K <sub>m</sub> >K' <sub>m</sub> V <sub>max</sub> < V' <sub>max</sub>	двухпараметрически согласованная активация
	$5 \times 10^{-11}$	33.9±0.5	4.5±0.5	K <sub>m</sub> <K' <sub>m</sub> V <sub>max</sub> < V' <sub>max</sub>	двухпараметрически рассогласованная активация
$1 \times 10^{-3}$	0	33±1	2.7±0.4		
	$5 \times 10^{-10}$	13.3±0.7	3.4±0.7	K <sub>m</sub> >K' <sub>m</sub> V <sub>max</sub> < V' <sub>max</sub>	двухпараметрически согласованная активация
	$5 \times 10^{-11}$	32.6±0.8	3.4±0.9	K <sub>m</sub> ≈ K' <sub>m</sub> V <sub>max</sub> < V' <sub>max</sub>	каталитическая активация

Согласно полученным данным, наиболее сильное воздействие пропанила на ИХЭ, которому отвечает наблюдение более выраженного эффекта активации, проявляется при концентрации субстрата БТХИ  $2 \times 10^{-3}$  М и именно эта концентрация была выбрана в качестве рабочей для определения этого пестицида. Для определения параоксона с помощью АХЭБ использовали концентрацию БТХИ  $1 \times 10^{-3}$  М. Выбор этой концентрации также основывался на получении наиболее выраженного эффекта ингибирования ИХЭ.

Все определения параоксона и пропанила с помощью АХЭБ проводились в рабочих фосфатных буферах с  $\text{pH} = 7.50 \pm 0.05$ , которое обеспечивает проявление достаточной активности ИХЭ и химическую стабильность изучаемых пестицидов в процессе их определения.

На *печатных планарных платиносодержащих электродах*, являющихся первичными преобразователями второго типа холинэстеразных биосенсоров, продукт ферментативного гидролиза (тиол) подвергается процессу окисления:



Изучение зависимости регистрируемых токов в растворах АТХИ ( $1 \times 10^{-3}$  М) на платиновых электродах в области потенциалов от +0.4 до 0.7 В в отсутствие и в присутствии холинэстеразы показало, что наибольшее значение аналитического сигнала относительно Ag/AgI псевдоэлектрода сравнения наблюдается при потенциале +0.6 В (рис. 1). При использовании иодид-содержащих субстратов следует учитывать процесс окисления иодид-ионов в близкой области потенциалов, поэтому в качестве рабочего использовался  $E = +0.5$  В, который обеспечивает хорошо выраженный аналитический сигнал в отсутствие влияния иода.

На основе систем из 4 платиновых электродов на единой подложке были созданы 2-канальные холинэстеразные биосенсоры двух типов путем иммобилизации ХЭ по отдельности на 2 электрода из четырех:

*тип I:* АХЭ электрического угря (АХЭ(эу)) и БуХЭ;

*тип II:* АХЭ сыворотки крови человека (АХЭ(ч)) и БуХЭ.

Для получения максимальных аналитических сигналов для функционирования полученных биосенсоров был выбран АТХИ, так как при использовании БТХИ не наблюдается значительного отклика АХЭ. Из зависимости откликов биосенсоров от концентрации АТХИ (рис. 2) следует, что на АХЭ(эу)-биосенсоре наблюдается выход на предел при концентрациях  $8 \div 10 \times 10^{-4}$  М, а на БуХЭ-биосенсоре с увеличением концентрации субстрата происходит дальнейшее увеличение отклика. Известно, что АХЭ может подвергаться ингибированию субстратом при концентрациях более  $1 \times 10^{-3}$  М.

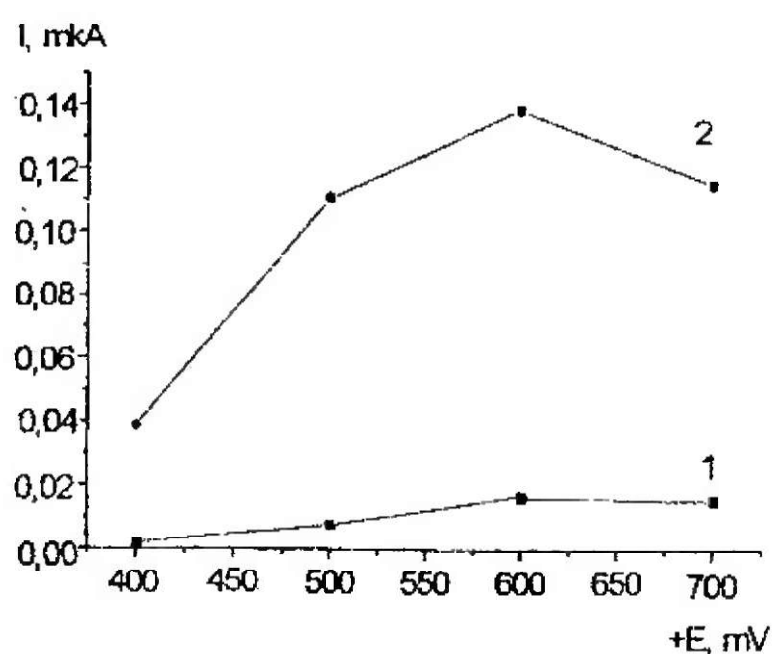


Рис.1. Зависимость величин токов окисления продукта гидролиза АТХИ ( $1 \times 10^{-3}$  М) от приложенного потенциала на платиновых печатных электродах в отсутствие (1) и в присутствии (2) БуХЭ.

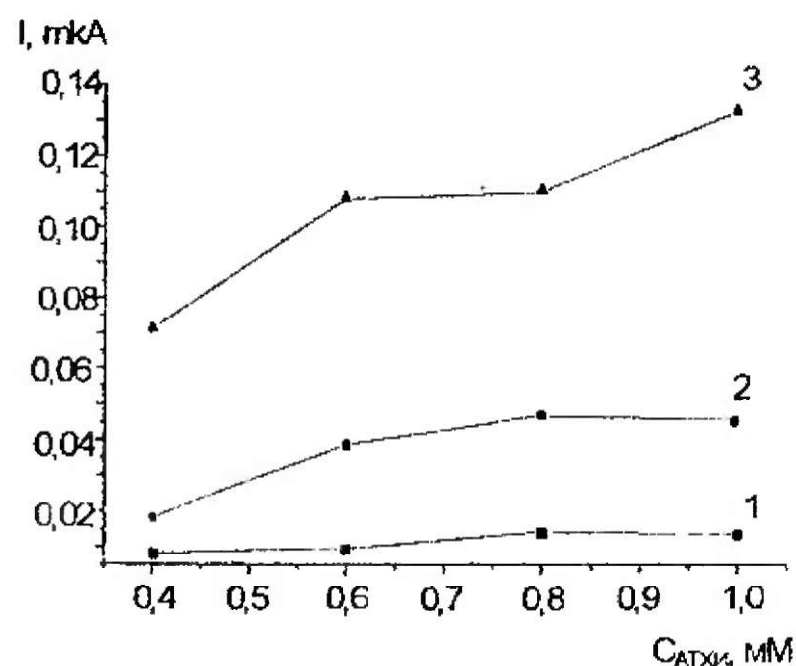


Рис.2. Зависимость величин токов окисления продукта гидролиза АТХИ от концентрации АТХИ на платиновых электродах в отсутствие холинэстеразы (1), в присутствии АХЭ электрического угря (2) или БуХЭ сыворотки крови лошади (3).

В связи с этим дальнейшая работа проводилась при концентрации АТХИ  $1 \times 10^{-3}$  М, которая одновременно обеспечивает максимальные сигналы обоих типов холинэстераз (АХЭ и БуХЭ).

Исследование влияния рН на величину отклика системы из холинэстеразных биосенсоров в фосфатных буферных растворах (50 мМ) в диапазоне значений рН от 7.0 до 8.0 показало, что на кривой зависимости величины тока от рН достижение наибольшей активности ИХЭ отмечается при  $pH = 7.50 \pm 0.05$  (рис.3).

Оценка изменения величин сигналов одного и того же двухканального холинэстеразного биосенсора (рис.4) показала, что при работе с неспецифическими эффекторами ХЭ один и тот же биосенсор можно использовать по крайней мере 5 раз, промывая биосенсор между измерениями в воде и рабочем фосфатном буфере в течение 5-10 минут.

Проведенные исследования ферментативной и электрохимических реакций были использованы при выборе рабочих условий для определения пестицидов с помощью предлагаемых холинэстеразных биосенсоров.

Аналитические возможности АХЭБ для определения пестицидов параоксона, пропанила, а также атразина и симазина и уравнения градуировочных графиков, построенные как зависимость величины тока от отрицательного логарифма концентрации, представлены в табл.2. В табл.3 показаны аналитические возможности двухканальных холинэстеразных биосенсоров I и II типов для определения пропанила и атразина (градуировочные графики строились как зависимость активности холинэстеразы в процентах от отрицательного логарифма концентраций).



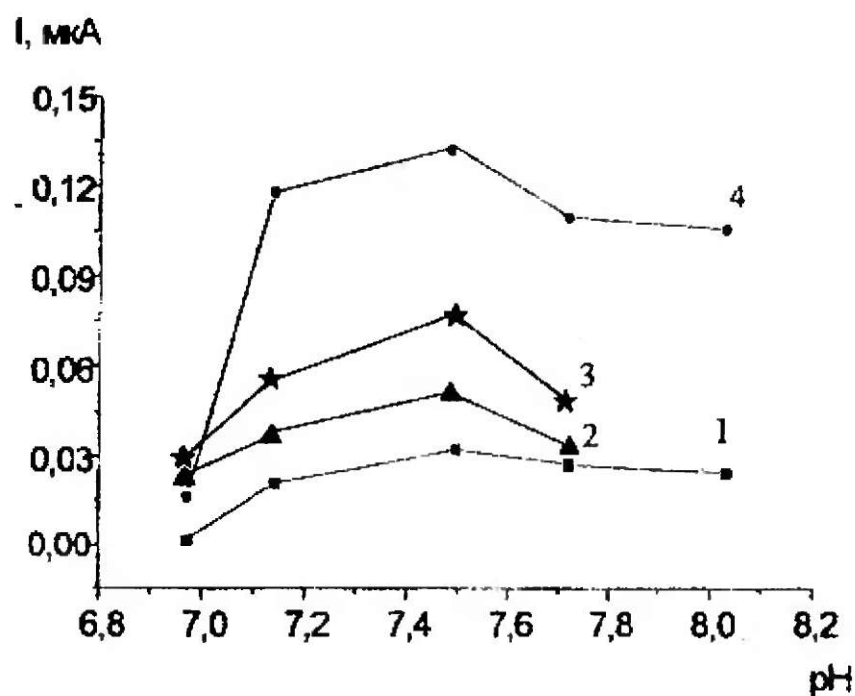


Рис.3. pH-зависимость отклика холинэстеразных биосенсоров (фосфатные буферы, 50 мМ):  
 (1) АХЭ(эу)-биосенсор (I тип 2х-канальных биосенсоров);  
 (2) БуХЭ-биосенсор (II тип);  
 (3) АХЭ(ч)-биосенсор (II тип);  
 (4) БуХЭ-биосенсор (I тип).

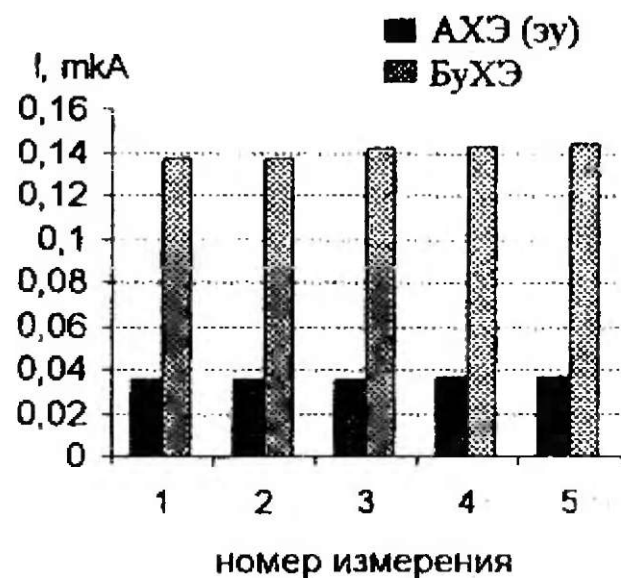


Рис.4. Изменение отклика одного и того же биосенсора (тип I) в растворах  $1 \times 10^{-3}$  М АТХИ в процессе работы с эффектором холинэстеразы.

Таблица 2.  
 Аналитические характеристики амперометрического холинэстеразного биосенсора для определения пестицидов

Пестицид	$C_{\text{БТХИ}}, \text{М}$	Диапазон концентраций	Уравнение градуировочного графика $I = a \times (-\lg C) \pm b$
Параоксон	$1 \times 10^{-3}$	$5 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-6}$	$I = (0.25 \pm 0.02) \times (-\lg C) + (2.52 \pm 0.08)$
Пропанил	$2 \times 10^{-3}$	$1 \times 10^{-12} - 1 \times 10^{-9}$	$I = (0.18 \pm 0.01) \times (-\lg C) + (1.12 \pm 0.09)$
Атразин	$2 \times 10^{-3}$	$8 \times 10^{-12} - 1 \times 10^{-6}$	$I = (0.85 \pm 0.02) \times (-\lg C) - (2.4 \pm 0.2)$
Симазин	$8 \times 10^{-4}$	$5 \times 10^{-15} - 1 \times 10^{-6}$	$I = (0.36 \pm 0.04) \times (-\lg C) + (0.7 \pm 0.1)$

Таблица 3.  
 Аналитические характеристики двухканальных холинэстеразных биосенсоров для определения пестицидов

Пестицид	Тип холинэстеразного биосенсора		Диапазоны рабочих концентраций	Уравнение градуировочного графика $Act\% = a \times (-\lg C) \pm b$
Пропанил	I	АХЭ(эу)	$1 \times 10^{-11} - 1 \times 10^{-7}$	$Act\% = (8 \pm 1) \times (-\lg C) + (58 \pm 9)$
		БуХЭ	$1 \times 10^{-11} - 1 \times 10^{-7}$	$Act\% = (12 \pm 1) \times (-\lg C) + (81 \pm 9)$
Атразин	II	АХЭ(ч)	$1 \times 10^{-11} - 1 \times 10^{-6}$	$Act\% = (12 \pm 1) \times (-\lg C) + (25 \pm 6)$
		БуХЭ	$1 \times 10^{-11} - 1 \times 10^{-6}$	$Act\% = (99.3 \pm 0.3) \times (-\lg C) + (27 \pm 3)$

В табл. 4 приведены результаты сравнения аналитических возможностей разработанных холинэстеразных биосенсоров различной конструкции на примере определения пропанила в модельных растворах с помощью АХЭБ и двухканальных холинэстеразных биосенсоров типа I. Полученные результаты показывают, что оба вида биосенсоров позволяют в одинаковой степени равноточно определять пропанил в диапазоне определяемых концентраций ( $F_{\text{расч.}} < F_{\text{табл.}}$ ) при незначительном расхождении между средними результатами ( $t_{\text{расч.}} < t_{\text{табл.}}$ ).

Таблица 4.

Результаты определения пропанила с помощью АХЭБ и двухканального холинэстеразного биосенсора типа I ( $n=5$ ,  $P=0.95$ ,  $F_{\text{табл.}}=6.39$ ,  $t_{\text{табл.}}=2.78$ )

1					
АХЭБ	$Sr \times 10^2$	АХЭ(эу)- биосенсор	$Sr \times 10^2$	$F_{\text{расч.}}$	$t_{\text{расч.}}$
$(3.2 \pm 0.2) \times 10^{-10}$	4.3	$(3.5 \pm 0.2) \times 10^{-10}$	5.0	3.31	2.35
$(4.1 \pm 0.4) \times 10^{-11}$	4.0	$(4.5 \pm 0.3) \times 10^{-11}$	9.3	3.29	2.63
2					
АХЭБ	$Sr \times 10^2$	БуХЭ- биосенсор	$Sr \times 10^2$	$F_{\text{расч.}}$	$t_{\text{расч.}}$
$(3.2 \pm 0.2) \times 10^{-10}$	4.3	$(3.4 \pm 0.2) \times 10^{-10}$	4.8	2.15	1.84
$(4.1 \pm 0.4) \times 10^{-11}$	4.0	$(4.4 \pm 0.4) \times 10^{-11}$	6.9	1.81	2.43
3					
АХЭ(эу)- биосенсор	$Sr \times 10^2$	БуХЭ- биосенсор	$Sr \times 10^2$	$F_{\text{расч.}}$	$t_{\text{расч.}}$
$(4.8 \pm 0.2) \times 10^{-8}$	4.2	$(4.8 \pm 0.3) \times 10^{-8}$	6.2	2.18	0
$(5.0 \pm 0.3) \times 10^{-10}$	5.0	$(4.7 \pm 0.4) \times 10^{-10}$	4.8	1.54	2.09
$(5.2 \pm 0.3) \times 10^{-11}$	9.3	$(5.8 \pm 0.4) \times 10^{-11}$	6.9	1.81	2.69

### Иммобилизованные антитела как аналитические реагенты

Принцип предлагаемого иммуноэкстракционного (ИЭ) определения пестицидов основан на извлечении определяемого соединения с помощью иммобилизованных Ат с последующим детектированием с помощью холинэстеразного биосенсора. Общая схема предлагаемого способа иммунохимического определения состоит из следующих стадий:

1. Инкубирование ИАт в анализируемом растворе. На этой стадии происходит образование иммунного комплекса Ат-Аг на поверхности мембраны с иммобилизованными антителами.
2. Перенос мембраны в раствор для разрушения иммунного комплекса (ИК). В результате разрушения ИК, пестицид переходит в раствор.
3. Определение пестицида с помощью холинэстеразного биосенсора.

Одним из необходимых шагов в осуществлении такого подхода является разработка способа получения ИАт на подходящих носителях. Разработаны 2 способа иммобилизации Ат с использованием АЦ и НЦ мембранных фильтров промышленного изготовления.

**способ I:** Этот способ основан на адсорбции Ат из их раствора на носителе, предварительно обработанном с помощью 5%-ного раствора ГА. Установлено, что в процессе иммобилизации некоторое количество Ат может удерживаться на поверхности носителя или ковалентно пришитых к нему Ат за счет слабых сорбционных взаимодействий. Для предотвращения загрязнения рабочих растворов на последующих стадиях определения в результате десорбции этих Ат под действием тех или иных факторов проводилось удаление излишка Ат с поверхности полученных ИАт путем их обработки растворами с большой ионной силой (1M NaCl) в течение 1 часа.

**способ II:** Способ состоит в равномерном нанесении раствора Ат на поверхность носителя с последующей обработкой в парах 12.5%-ного ГА в течение 1 часа. Следует отметить, что при использовании мембранных фильтров с размером пор 1 мкм для получения ИАт с достаточной степенью удерживания на носителе необходима дополнительная обработка их после иммобилизации Ат в растворе ТРИС-HCl буфера, содержащего 1 M NaCl для удаления слабо удерживаемых Ат с поверхности носителя. При использовании же мембран с размером пор 0.2 мкм такая процедура не нужна.

Сравнение двух разработанных методик получения ИАт показывает, что использование II способа наиболее предпочтительно с точки зрения экономии специфичных Ат, получение которых в больших количествах является трудоемким и дорогостоящим процессом. Кроме того, такой вариант иммобилизации намного проще и в отличие от способа I позволяет, используя одну и ту же процедуру, получать ИАт в произвольном количестве, при этом свойства ИАт воспроизводятся при переходе от одной мембраны к другой.

### ***Иммунохимическое определение пестицидов различных классов в воде***

При осуществлении первой и второй стадии ИЭ время инкубирования в рабочих растворах сохраняется одинаковым – 15 минут. Для проведения стадии разрушения образующихся ИК Ат-пестицид при осуществлении процесса ИЭ пестицидов атразина, симазина и пропанила использовали раствор HCl, содержащий 0.15M NaCl (pH=4). В табл. 5 суммированы диапазоны рабочих концентраций, нижние границы определяемых содержаний и уравнения градуировочных графиков для иммунохимического определения исследуемых пестицидов.



Таблица 5.

**Аналитические характеристики иммунохимического определения  
пестицидов в воде**

Пестицид	Диапазон рабочих концентраций	Уравнение градуировочного графика $I=a \times (-\lg C) \pm b$	$C_{\text{н}}$ , моль/л
Параоксон	$3 \times 10^{-9} - 1 \times 10^{-7}$	$I=(0.31 \pm 0.03)(-\lg C) - (0.8 \pm 0.3)$	$1 \times 10^{-9}$
Пропанил	$8 \times 10^{-12} - 1 \times 10^{-8}$	$I=(0.12 \pm 0.02)(-\lg C) + (4.8 \pm 0.6)$	$5 \times 10^{-12}$
Атразин	$5 \times 10^{-11} - 1 \times 10^{-7}$	$I=(0.45 \pm 0.01)(-\lg C) + (2.5 \pm 0.1)$	$1 \times 10^{-11}$
Симазин	$1 \times 10^{-11} - 1 \times 10^{-7}$	$I=(0.27 \pm 0.04)(-\lg C) + (4.1 \pm 0.4)$	$5 \times 10^{-12}$

Иммунологические взаимодействия Аг с ИАт были охарактеризованы константами образования иммунного комплекса ( $K_A$ ). Значения  $K_A$  представлены в табл.6. Графическая обработка экспериментальных данных в координатах Скэтчарда позволяет вычислить не только равновесную  $K_A$ , но и определить рабочую концентрацию Ат в системе.

Таблица 6.

**Константы связывания иммунных комплексов Ат-пестицид ( $n=5$ ,  $r=0.95$ )**

Пестицид	Константа связывания, $K_A$ , моль <sup>-1</sup>		Рабочая концентрация антител, моль/л
	$K_{A1}$	$K_{A2}$	
Параоксон	$(5.8 \pm 0.3) \times 10^{10}$	$(5.3 \pm 0.2) \times 10^9$	$4.8 \times 10^{-8}$
Пропанил	$(1.4 \pm 0.1) \times 10^{14}$	$(6.4 \pm 0.2) \times 10^{12}$	$6.4 \times 10^{-9}$
Атразин	$(5.8 \pm 0.2) \times 10^9$	$(4.0 \pm 0.1) \times 10^8$	$1.6 \times 10^{-8}$
Симазин	$(1.5 \pm 0.2) \times 10^{11}$	$(4.3 \pm 0.2) \times 10^8$	$5.1 \times 10^{-9}$

Важной задачей при проведении анализа с применением иммобилизованных иммунореагентов является оценка специфичности иммунологической реакции. Изучение взаимодействия Аг с используемыми носителями без иммобилизованных Ат и с носителями, на которых с помощью разработанных способов был иммобилизован БСА показало, что при использовании АЦ-мембран возможно слабое неспецифическое взаимодействие изучаемых соединений в отсутствие центров специфического иммунологического связывания, значение которого мало (0.01-0.05%).

Оценка перекрестной реактивности взаимодействия Ат против параоксона показала, что Ат против параоксона не образуют иммунные комплексы с атразином, но в то же время способны взаимодействовать с паратионом, образуя иммунные комплексы Ат-пестицид (процент перекрестных реакций составил 10%). Изучение связывания ИАт против пропанила с такими гербицидами как симазин и атразин показало, что процент перекрестного реагирования ИАт с симазинном не превышает 4 %, а с атразином взаимодействия не было зафиксировано. Проценты перекрестной реактивности Ат против симазина имеют небольшие значения и составляют 0.5% для

атразина, а для другого родственного триазинового соединения пропазина – 1.3%. Проценты перекрестных реакций против атразина составляют 12.5% для симазина и 0.25% для пропазина.

### *Иммунохимическое определение пестицидов разных классов в водно-органических средах*

Плохая растворимость некоторых пестицидов в воде и необходимость экстракции пестицидов из различных объектов анализа с помощью органических растворителей диктует необходимость изучения проведения иммунохимических реакций в присутствии органических растворителей. Полученные результаты исследований иммунохимических взаимодействий в присутствии ацетона, ацетонитрила и этанола (10%-ное объемное содержание) (табл.7) демонстрируют, что иммунхимические реакции в выбранных водно-органических системах происходят, но не во всем диапазоне изученных концентраций.

Таблица 7

Влияние растворителей на иммунологические реакции Ат-пестицид

Растворитель	Диапазон исследованных концентраций, М	
	Иммунологическое связывание наблюдается (уравнение градуировочного графика $I=a \times (-\lg C) \pm b$ )	Отсутствие иммунологического связывания
Атразин		
Этанол	-	$5 \times 10^{-9} - 1 \times 10^{-7}$
Ацетон	$1 \times 10^{-8} - 1 \times 10^{-7}$ ( $I=(0.8 \pm 0.1) \times (-\lg C) + (1.2 \pm 0.4)$ )	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-8}$
Ацетонитрил	-	-
Симазин		
Этанол	$1 \times 10^{-8} - 1 \times 10^{-7}$ ( $I=(2.01 \pm 0.03) \times (-\lg C) - (9.9 \pm 0.2)$ )	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-8}$
Ацетон	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-7}$ ( $I=(0.20 \pm 0.02) \times (-\lg C) + (3.6 \pm 0.3)$ )	-
Ацетонитрил	$1 \times 10^{-8} - 1 \times 10^{-7}$ ( $I=(1.7 \pm 0.3) \times (-\lg C) - (7.0 \pm 1.0)$ )	$5 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-8}$
Пропанил		
Этанол	$1 \times 10^{-9} - 1 \times 10^{-6}$ ( $I=(0.9 \pm 0.1) \times (-\lg C)$ )	-
Ацетон	$1 \times 10^{-9} - 1 \times 10^{-7}$ ( $I=(1.44 \pm 0.01) \times (-\lg C) - (5.4 \pm 0.1)$ )	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-9}$
Ацетонитрил	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-7}$ ( $I=(0.48 \pm 0.07) \times (-\lg C) + (2.2 \pm 0.6)$ )	-



В большинстве случаев результат иммунологической реакции можно было зарегистрировать лишь в присутствии больших концентраций Аг в растворе. В изученных областях малых концентраций иммунохимическое взаимодействие Аг-Ат в некоторых случаях зафиксировано не было. Это свидетельствует о том, что присутствие органического растворителя, в общем случае, снижает способность Ат связывать Аг, что сказывается на ухудшении чувствительности определения в таких системах.

На примере пестицида пропанила была оценена аффинность взаимодействий Ат-пестицид в присутствии органических растворителей. Для этого были определены константы связывания по графикам Скэтчарда (табл.8). Вероятно, полученные результаты могут быть объяснены наличием зависимости между растворимостью пропанила в изучаемых растворителях и прочностью иммунных комплексов. Для ацетона, который более всего подходит как растворитель для пропанила,  $K_A$  меньше, чем в воде. Растворимость пропанила в этаноле хуже, а константы связывания в свою очередь имеют значения больше, чем в ацетоне. Для ацетонитрила же аффинность взаимодействий близка к той, что характерна для воды.

Таблица 8.

Константы связывания иммунных комплексов Ат-пропанил в водно-органических средах (n=5, p=0.95)

Растворитель	Константа связывания, $K_A$ , моль <sup>-1</sup>	
	$K_{A1}$	$K_{A2}$
Этанол	$(1.2 \pm 0.3) \times 10^{11}$	$(8.3 \pm 0.4) \times 10^8$
Ацетон	$(1.4 \pm 0.1) \times 10^{10}$	$(1.7 \pm 0.5) \times 10^8$
Ацетонитрил	$(6.3 \pm 0.4) \times 10^{14}$	$(1.4 \pm 0.3) \times 10^{11}$

Оценка эффективности процесса иммуноэкстракции пестицидов с помощью ИАт, иммобилизованных на мембраны промышленного изготовления, показала, что в процессе стадии образования ИК переход Аг из раствора на мембрану с ИАт происходит почти полностью (степень извлечения не менее 86-98%), а разрушение образовавшегося ИК идет в меньшей степени. Очевидно, это свидетельствует о том, что, вследствие высокой аффинности Ат, образующиеся ИК являются достаточно прочными и разрушаются лишь частично в используемых нами условиях стадии разрушения. Вероятно, стадия разрушения ИК в целом является лимитирующей во всем процессе ИЭ и выбор условий ее проведения является важным для обеспечения полного разрушения ИК. Однако условия эти (ионная сила, рН, природа реагента) должны одновременно позволять проводить ИЭ, избегая деструктивного воздействия на Аг, центры связывания Ат и на прочность удерживания ИАт на носителе. Выбранные нами условия иммуноэкстракции из водных и водно-органических растворов с использованием НЦ и АЦ мембранных фильтров промышленного



изготовления отвечают именно этим требованиям. Благодаря аналитическим возможностям амперометрических холинэстеразных биосенсоров обеспечивать определение пестицидов в широких областях концентраций, предлагаемый способ ИЭ является эффективным в определенных концентрационных диапазонах.

### Иммуноэкстракционное определение пестицидов в пищевых продуктах

Разработанный способ иммуноэкстракционного определения был опробован в анализе пестицидов в некоторых пищевых продуктах.

#### Определение параксона в винограде и апельсинах

Использование в России фосфорорганического пестицида паратиона не разрешено, но в зарубежных странах его продолжают использовать против вредителей фруктовых культур (винограда, апельсинов, слив, яблок и т.д.). При действии окислителей паратион легко переходит в кислородный аналог -- параоксон. На основе проведенных исследований нами был разработан селективный метод иммунохимического определения параоксона в винограде и апельсинах. В табл.9 показано определение параоксона в модельных образцах, изготовленных на основе соков "Я" (г.Лебедянь, Липецкая область).

Таблица 9

Иммуноэкстракционное определение параоксона в апельсиновом и виноградном соках с помощью АХЭБ (n=5, p=0.95)

Введено, моль/л	Найдено, моль/л	Sr×10 <sup>2</sup>
апельсиновый сок		
7×10 <sup>-9</sup>	(6.1±0.2)×10 <sup>-9</sup>	6.2
5×10 <sup>-9</sup>	(5.8±0.1)×10 <sup>-9</sup>	8.7
3×10 <sup>-9</sup>	(2.5±0.2)×10 <sup>-9</sup>	13.9
виноградный сок		
7×10 <sup>-9</sup>	(6.3±0.2)×10 <sup>-9</sup>	3.1
5×10 <sup>-9</sup>	(4.7±0.2)×10 <sup>-9</sup>	4.3
3×10 <sup>-9</sup>	(3.3±0.1)×10 <sup>-9</sup>	8.0

В качестве реальных объектов анализа были выбраны виноград и апельсины, выращенные за рубежом и реализуемые на российском рынке: виноград из Италии, Африки, Аргентины, апельсины из Италии и Марокко. Перед проведением иммуноэкстракции свежавыжатый сок из фруктов отфильтровывали от частичек мякоти и разбавляли в 10 раз, затем проводили определение концентрации параоксона с помощью холинэстеразного биосенсора. Проведенный анализ показал, что в исследованных образцах параоксон не содержался.

### Определение пропанила в рисе

Предлагаются методики определения пропанила в рисе, одна из которых включает предварительную жидкостную экстракцию водой, а другая – жидкостную экстракцию с помощью ацетона. На стадии определения с помощью биосенсора полученный экстракт разбавляли в 10 раз. В качестве объектов анализа были выбраны 4 образца риса, выращенные за рубежом и продаваемые на российском рынке. Полученные результаты (табл.10) выявили остаточное содержание пропанила в образцах риса из США, Таиланда и Вьетнама, однако уровень обнаруженных концентраций гораздо ниже допустимых остаточных количеств этого пестицида в рисе (0.3 мг/кг).

Таблица 10

Иммунохимическое определение пропанила в образцах риса с помощью иммобилизованных антител и АХЭБ (n=3, p=0.95))

Образцы (страна- производитель)	Содержание пестицида			
	экстракция водой		экстракция ацетоном	
	$C_{\text{пест}}, \text{ мг/кг}$	$S_r \times 10^2$	$C_{\text{пест}}, \text{ мг/кг}$	$S_r \times 10^2$
Таиланд	$(6.9 \pm 0.7) \times 10^{-8}$	10.1	$(1.3 \pm 0.2) \times 10^{-7}$	9.2
США	$(2.9 \pm 0.4) \times 10^{-8}$	6.8	$(4.9 \pm 0.7) \times 10^{-8}$	11.3
Вьетнам	не обнаружено	-	$(9.1 \pm 0.9) \times 10^{-9}$	10.2
Индия	не обнаружено	-	не обнаружено	-

### Определение симазина в молоке и молочных продуктах

Симазин – представитель широко распространенной группы сим-триазиновых гербицидов -относится к важным объектам постоянного контроля, так как его содержание в некоторых пищевых продуктах и воде не допускается. Результаты определений симазина с помощью разработанного метода в модельных образцах молока представлены в табл.11. Показано, что предлагаемый вариант иммунохимического определения позволяет также определять симазин в присутствии родственных соединений ( $S_r < 0.058$ ). Пробоподготовка образцов молока сводилась лишь к их разбавлению перед проведением иммуноэкстракции в 10 раз. Данная процедура проводилась для того, чтобы уменьшить возможные матричные влияния. Проведенный анализ нескольких образцов молочных продуктов, а именно молока пастеризованного, кефира нежирного (продукция ООО "Эдельвейс-М", г.Казань) и молока не пастеризованного (Лаишевский район, Татарстан) показал отсутствие симазина.

Результаты определения симазина в модельных образцах молока с использованием иммобилизованных антител и АХЭБ ( $n=5$ ,  $p=0.95$ )

Образец	Введено, моль/л	Найдено, моль/л	$S_r$
симазин	$5.0 \times 10^{-9}$	$(4.8 \pm 0.4) \times 10^{-9}$	0.08
	$2.5 \times 10^{-9}$	$(1.3 \pm 0.5) \times 10^{-9}$	0.20
	$5.0 \times 10^{-10}$	$(5.0 \pm 0.5) \times 10^{-10}$	0.10
смесь пестицидов: симазин, атразин, пропазин	$5 \times 10^{-10}$ $5 \times 10^{-10}$ $5 \times 10^{-11}$	$(2.0 \pm 0.5) \times 10^{-10}$	0.16

### Определение атразина в воде и апельсиновом соке

Предлагаемый нами вариант иммуноэкстракционного определения пестицидов был использован в рамках межлабораторного международного анализа гербицида триазинового ряда атразина в воде и апельсиновом соке. Для проведения иммуноэкстракционного определения атразина, позволяющего осуществить его в оптимальных условиях, были разработаны методики определения атразина в воде с предварительным разбавлением образцов воды в 10 раз и в соке с предварительным разбавлением образцов в 100 раз. Разбавление было необходимо в связи с тем, что предлагаемый иммуноэкстракционный метод обладает высокой чувствительностью, а некоторые предоставленные образцы содержали такие концентрации пестицида, которые не входят в изученный нами диапазон. Кроме этого, разбавление обеспечивало одновременное снижение влияния матрицы.

В табл.12 приведены результаты трех параллельных определений атразина в предоставленных образцах, проведенные в нашей лаборатории.

Как было предварительно установлено, в образцах чистого сока и воды, на основе которых изготавливались образцы, содержащие атразин, этот пестицид не содержался. Сравнение полученных нами данных с общими результатами межлабораторного теста показывает, что предлагаемый нами метод по точности определения не уступает хроматографическому и иммуноферментному анализу, которые являются на сегодняшний день одними из самых распространенных для обеспечения контроля содержания пестицидов в различных объектах.



Результаты определения атразина в воде и апельсиновом соке

Образец	Введено мкг/л	1 анализ мкг/л	2 анализ мкг/л	3 анализ мкг/л	Среднее мкг/л	Sr
САН	50	120	83	110	104	0.18
ВАН	0.2	0.30	0.32	0.29	0.30	0.05
ВAB	1.5	1.29	1.62	1.25	1.39	0.15
ССН	75	150	240	190	193	0.23
ВСН	0.3	0.21	0.26	0.18	0.22	0.18
BCB	2	2.50	2.90	2.05	2.48	0.17

Обозначения образцов:

САН – сок с низкой концентрацией атразина (50-500 мкг/л);

ВАН – вода с низкой концентрацией атразина (0.1-1 мкг/л);

ВAB – вода с высокой концентрацией атразина (1-10 мкг/л);

ССН – сок с низкой концентрацией атразина в смеси с другими пестицидами (50-500 мкг/л);

ВСН – вода с низкой концентрацией атразина в смеси с другими пестицидами (0.1-1 мкг/л);

BCB – вода с высокой концентрацией атразина в смеси с другими пестицидами (1-10 мкг/л).

Таким образом, к отличительным особенностям предлагаемого способа иммуноэкстракционного анализа пестицидов в пищевых продуктах следует отнести высокую селективность и чувствительность определения. Выбранные схема и условия проведения такого варианта ИХА позволяют проводить определение достаточно быстро и с минимальным количеством необходимых операций. Во многих случаях такой вариант иммуноопределения отличает отсутствие многостадийной и сложной пробоподготовки образцов. В целом, аналитические характеристики предлагаемого способа иммуноэкстракционного определения позволяют говорить о перспективности его дальнейшего практического применения, а также расширении области использования для определения различных веществ другой природы.

### Выводы

1. Показана возможность иммуноэкстракционного определения остаточных количеств пестицидов различных классов (фосфорорганического инсектицида параоксона, анилидного гербицида пропанила, триазиновых гербицидов симазина и атразина) с помощью иммобилизованных антител и разных видов холинэстеразных биосенсоров.
2. Установлены рабочие условия определения пестицидов пропанила и параоксона с помощью амперометрического холинэстеразного биосенсора (рН фосфатного буферного раствора  $7.50 \pm 0.05$ ;  $C_{\text{БТХИ}} = 1 \times 10^{-3}$  М для параоксона и  $C_{\text{БТХИ}} = 2 \times 10^{-3}$  М для пропанила). Динамические области концентраций составили для параоксона  $5 \times 10^{-10}$  -  $1 \times 10^{-6}$  М, для пропанила

- $1 \times 10^{-12}$  -  $1 \times 10^{-9}$  М. Активирующее действие пропанила на холинэстеразу установлено впервые.
3. Разработаны холинэстеразные биосенсоры на основе планарных печатных платиновых электродов для определения пестицидов пропанила, атразина и симазина. Подобраны рабочие условия определения пестицидов с использованием этих биосенсоров (рН фосфатного буферного раствора  $7.50 \pm 0.05$ ;  $C_{ATXH} = 1 \times 10^{-3}$  М; рабочий потенциал  $E = +500$  мВ). В области изученных концентраций от  $1 \times 10^{-12}$  до  $1 \times 10^{-6}$  М установлены рабочие диапазоны определения пестицидов разных классов.
  4. Разработаны 2 способа получения иммобилизованных антител с использованием ацетатцеллюлозных и нитратцеллюлозных мембранных фильтров промышленного изготовления, отличающиеся простотой выполнения и позволяющие сохранять иммунологические свойства в течение не менее месяца.
  5. Значения констант связывания иммунных комплексов Ат-пестицид, как характеристики полученных иммуноэкстрагентов составляют для параоксона  $K_{A1} = (5.8 \pm 0.3) \times 10^{10}$ ,  $K_{A2} = (5.3 \pm 0.2) \times 10^9$ ; для пропанила  $K_{A1} = (1.4 \pm 0.1) \times 10^{14}$ ,  $K_{A2} = (6.4 \pm 0.2) \times 10^{12}$ , для атразина  $K_{A1} = (5.8 \pm 0.2) \times 10^9$ ,  $K_{A2} = (4.0 \pm 0.1) \times 10^8$ , для симазина  $K_{A1} = (1.5 \pm 0.2) \times 10^{11}$ ,  $K_{A2} = (4.3 \pm 0.2) \times 10^8$ .
  6. Найдены условия иммуноэкстракционного определения пропанила, атразина и симазина в водно-органических средах (10% водно-органический раствор ацетонитрила, ацетона и этанола). Значения констант связывания иммунных комплексов Ат-пропанол в присутствии этанола составили  $K_{A1} = (1.2 \pm 0.3) \times 10^{11}$ ,  $K_{A2} = (8.3 \pm 0.4) \times 10^8$ , в присутствии ацетона  $K_{A1} = (1.4 \pm 0.1) \times 10^{10}$ ,  $K_{A2} = (1.7 \pm 0.5) \times 10^8$ , в присутствии ацетонитрила  $K_{A1} = (6.3 \pm 0.4) \times 10^{14}$ ,  $K_{A2} = (1.4 \pm 0.3) \times 10^{11}$ .
  7. Предложены иммуноэкстракционные методики определения пестицидов в пищевых продуктах: симазина в молоке и молочных продуктах, параоксона в винограде и апельсинах, пропанила в рисе, атразина в воде и апельсиновом соке.

Основные результаты диссертации изложены в следующих публикациях:

1. Медянцева Э.П., Кутырева М.П., Фахреева Э.Р., Ильичева Н.Ю., Еремин С.А., Будников Г.К. Иммунохимический анализ гербицидов группы сим-1,3,5-триазинов с помощью амперометрического холинэстеразного биосенсора // Агрохимия. 2000. №3. С. 72-80.
2. Medyantseva E. P., Kuttyreva M. P., Ilyicheva N. Y., Eremin S.A., Budnikov H.C. An application of cholinesterase amperometric biosensor in environment



- monitoring of sim-1,3,5-triazine herbicides contamination // Abstract of the 8<sup>th</sup> International Conference on ElectroAnalysis. Bonn, Germany. 2000. P.C39.
3. Ильичева Н.Ю., Кутырева М.П., Медянцева Э.П., Еремин С.А., Будников Г.К. Иммунохимические реакции для селективного определения триазиновых гербицидов // Тез. докл. Всеросс. конф. "Химический анализ веществ и материалов." Москва, Россия. 2000. С.123-124.
  4. Ильичева Н.Ю., Медянцева Э.П., Кутырева М.П., Еремин С.А., Будников Г.К. Применение амперометрического холинэстеразного биосенсора в мониторинге остаточных количеств сим-1,3,5-триазиновых гербицидов в воде и молочных продуктах // Тезисы докл. Всеросс. конф. с международным участием "Сенсор 2000". Санкт-Петербург, Россия. 2000. С.95.
  5. Медянцева Э.П., Ильичева Н.Ю., Кутырева М.П., Будников Г.К., Еремин С.А. Селективное определение сим-1,3,5-триазиновых гербицидов в природных водах.// Тезисы докл. IV Всеросс. конф. по анализу объектов окружающей среды "Экоаналитика-2000" с международным участием. Краснодар, Россия. 2000. С.323-324.
  6. Ильичева Н.Ю., Медянцева Э.П., Бейлинсон Р.М., Будников Г.К., Еремин С.А. Использование амперометрического холинэстеразного биосенсора в определении следов пестицидов в пищевых продуктах.// Тезисы докладов Поволжской региональной конференции по аналитической химии. Казань, Россия. 2001. С.143.
  7. Medyantseva E.P., Ilyicheva N.Y., Kutyreva M.P., Beylinson R.M., Eremin S.A., Budnikov H.C. Separation Technique Based on Immunological Reactions for Determination of Pesticides. // Abstract of symposium on high-performance separation technique. Siofok, Hungary. 2001. A42.
  8. Ильичева Н.Ю., Халдеева Е.В., Складал П., Медянцева Э.П. Иммунохимическое определение пестицидов симазина и атразина с помощью screen-printed электродов. Тезисы докладов региональной научной конференции "Методы аналитического контроля материалов и объектов окружающей среды". Пермь, Россия, 2001. С. 147.
  9. Medyantseva E.P., Ilyicheva N.Y., Beylinson R.M., Eremin S.A., Budnikov H.C. Application of kinetic studies for optimization of pesticides determination. // Abstr. 7<sup>th</sup> International Symposium on kinetics in analytical chemistry. Bucharest, Romania. 2001. P24.
  10. Ильичева Н.Ю., Бейлинсон Р.М. Определение параоксона с помощью иммобилизованных антител и амперометрического холинэстеразного биосенсора. // Тезисы докладов III Всероссийской конференции молодых ученых "Современные проблемы теоретической и экспериментальной химии". Саратов, Россия. 2001. С.163.



- 11.Ильичева Н.Ю., Медянцева Э.П., Будников Г.К. Холинэстеразные биосенсоры на основе Pt-содержащих планарных электродов в микроанализе пестицидов // Тез. докл. Всеросс. конф. "Актуальные проблемы аналитической химии". Москва, Россия. 2002. Т.1, С.59.
- 12.Ильичева Н.Ю., Медянцева Э.П., Бейлинсон Р.М., Еремин С.А., Будников Г.К. Иммобилизация антител на различных носителях на основе эфиров целлюлозы // Тез. докл. Всеросс. конф. "Актуальные проблемы аналитической химии". Москва, Россия. 2002. Т.2, С.50.
- 13.Ilyicheva N.Y., Beylinson R.M., Medyantseva E.P., Budnikov H.C. Cholinesterase biosensors for herbicide propanil determination // Abstr. International Conf. "Biocatalysis-2002: Fundamentals & Applications" Moscow, Russia. 2002. P96.
- 14.Медянцева Э.П., Ильичева Н.Ю., Еремин С.А., Будников Г.К. Иммуноэкстракция остаточных количеств пестицидов различных классов с амперометрическим детектированием // Материалы межд. симпоз. "Разделение и концентрирование в аналитической химии." Краснодар, Россия. 2002. С.199.
- 15.Ильичева Н.Ю., Медянцева Э.П., Будников Г.К. Иммуноэкстракционное определение остаточных количеств гербицида симазина в воде и молочных продуктах с амперометрическим детектированием // Аналитика и контроль. 2002 г. Т.6, №5. С. 538-544.
- 16.Ильичева Н.Ю., Бейлинсон Р.М., Медянцева Э.П., Будников Г.К., Ванягина О.Н. Холинэстеразные биосенсоры для определения гербицида пропанила. // Вестник МГУ. 2003 г. Т.43, №6. С. 408-411.